

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-213804

(P2001-213804A)

(43) 公開日 平成13年8月7日 (2001.8.7)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト (参考)
A 6 1 K 45/00	1 0 1	A 6 1 K 45/00	1 0 1 4 B 0 6 4
39/395		39/395	L 4 C 0 8 4
			T 4 C 0 8 5
49/00		49/00	Z 4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 請求項の数25 O L (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-22898 (P2000-22898)

(22) 出願日 平成12年1月31日 (2000.1.31)

(71) 出願人 000003311

中外製薬株式会社

東京都北区浮間5丁目5番1号

(72) 発明者 関森 泰男

静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

(72) 発明者 宮本 創

静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

(74) 代理人 100077517

弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗組織因子抗体の複合体

(57) 【要約】

【課題】 新規な抗ヒト組織因子抗体複合体の提供。

【解決手段】 抗ヒト組織因子抗体と、化学療法剤、トキシン又は血管新生阻害剤との複合体であり、抗腫瘍医薬組成物の活性成分として有用である。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 組織因子に対する抗体（抗組織因子抗体）又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤とを連結して成る複合体。

【請求項2】 組織因子に対する抗体又は抗原結合能を有するその断片とトキシンとをリンカーにより連結して成る複合体。

【請求項3】 組織因子に対する抗体又は抗原結合能を有するその断片と血管新生阻害剤とを連結して成る複合体。

【請求項4】 前記組織因子が配列番号：1に示すアミノ酸配列を有する請求項1～3のいずれか1項に記載の複合体。

【請求項5】 前記抗組織因子抗体がモノクローナル抗体である請求項1～4のいずれか1項に記載の複合体。

【請求項6】 前記抗組織因子抗体が再構成ヒト抗体である請求項1～4のいずれか1項に記載の複合体。

【請求項7】 前記再構成ヒト抗体がヒト抗体である、請求項1～4のいずれか1項に記載の複合体。

【請求項8】 前記抗組織因子抗体の抗原結合能を有する断片が、Fab, F(ab')₂, scFv又はsc(Fv)₂である、請求項1～7のいずれか1項に記載の複合体。

【請求項9】 前記化学療法剤が、抗腫瘍剤である、請求項1～8のいずれか1項に記載の複合体。

【請求項10】 前記抗腫瘍剤がメルファラン (Melphalan)、シスプラチン (Cis-platinum)、カルボプラチン (Carboplatin)、マイトマイシンC (Mitomycin C)、アドリアマイシン (Adriamycin; Doxorubicin)、ダウノルビシン (Daunorubicin)、ブレオマイシン (Bleomycin)、ネオカルチノスタチン (Neocarzinostatin)、メトトレキサート (Methotrexate)、5-フルオロウリジン (5-Fluorouridine)、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン (5-Fluoro-2'-deoxyuridine)、シトシンアラビノシド (Cytosine arabinoside)、アミノプテリン (Aminopterin)、ビンクリスチン (Vincristine)、パクリタキセル (Paclitaxel)、ドセタキセル (Docetaxel) 又はビンデシン (Vindesine) である、請求項9に記載の複合体。

【請求項11】 前記化学療法剤が、サイトカインである、請求項1～8のいずれか1項に記載の複合体。

【請求項12】 前記サイトカインが、インターロイキン-2、腫瘍壊死因子アルファ (TNF α) またはインターフェロン (IFN) である、請求項11に記載の複合体。

【請求項13】 前記トキシンが、ジフテリヤトキシンA鎖 (Diphtheria toxin A chain)、シュドモナスエンドトキシン (Pseudomonas endotoxin)、リシンA鎖 (Ricin A chain)、無糖鎖リシンA鎖 (Deglycosylated ricin A chain)、A鎖 (A chain)、ゲロニン (Geloin)、ポークウィード抗ウィルス蛋白 (PAPs; Pokeweed

anti-viral protein from seeds)、ブリオジン (Briodin)、サポリン (Saporin)、モモルジン (Momordin)、モモルコキン (Momorcochin)、ジアンシン32 (Dianthin 32)、ジアンシン30 (Dianthin 30)、モデッシン (Modeccin)、ビスカミン (Viscumin)、ボルケシン (Volkesin)、ドデカンドリン (Dodecandrin)、トリチン (Iritin)、ルフィン (Luffin) 又はトリコキリン (Trichokirin) である、請求項2及び4～8のいずれか1項に記載の複合体。

10 【請求項14】 抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤とをリンカーにより連結して成る請求項1及び4～12のいずれか1項に記載の複合体。

【請求項15】 化学療法剤を結合あるいは内封したリボソーム、ミセル、あるいは多孔質ポリマーをリンカーにより連結した抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片を含んで成る複合体。

【請求項16】 血管新生阻害剤を結合あるいは内封したリボソーム、ミセル、あるいは多孔質ポリマーをリンカーにより連結し抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片を含んで成る複合体。

【請求項17】 トキシンを結合あるいは内封したリボソーム、ミセル、あるいは多孔質ポリマーをリンカーにより連結した抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片を含んで成る複合体。

【請求項18】 前記リンカーが、3-(2-ビリジルジチオール) プロピオニルヒドラジド、N-スクシニミジル 3-(2-ビリジルジチオール) プロピオネート、L-スクリニミジル 3-(2-ビリジルジチオール) プロピオネート、スルホ-L-スクリニミジル 3-(2-ビリジルジチオール) プロピオネート、N-スクシニミジル 3-(2-ビリジルジチオール) ブチレート、スクシニミジロキシカルボニル- α -(2-ビリジルジチオール) トルエン、L-スクリニミジロキシカルボニル- α -(2-ビリジルジチオール) トルエン、スルホ-L-スクリニミジロキシカルボニル- α -(2-ビリジルジチオール) トルエン、スクシニミジル 4-(p-マレイミドフェニル) ブチレート、スルホ-スクシニミジル 4-(p-マレイミドフェニル) ブチレート、m-マレイミドベンゾイル-N-ハイドロキスクシニミドエステル、スルホ-m-マレイミドベンゾイル-N-ハイドロキスクシニミドエステル、S-アセチルメルカプトスクシニクアンヒドライド、ジメチル 3,3-ジチオビスプロピオニミデート又は2-イミノチオレンである、請求項2～17のいずれか1項に記載の複合体。

【請求項19】 前記リンカーがペプチド、カルボキシメチルデキストラン (CM)、アジピン・ビオチン、ポリエチレングリコール (PEG)、デキストラン、アミノデキストラン、シス・アコニット酸、グルタミン酸ジヒドラジド、又はヒト血清アルブミン (HSA) である、請求項

2～17のいずれか1項に記載の複合体。

【請求項20】 抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤とを中間支持体により連結して成る請求項1、4～12のいずれか1項に記載の複合体。

【請求項21】 抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片とトキシンとを中間支持体により連結して成る請求項2～8、13及び15～17のいずれか1項に記載の複合体。

【請求項22】 前記中間支持体がペプチド、カルボキシメチルデキストラン(CM)、アビジン・ビオチン、ポリエチレングリコール(PEG)、デキストラン、アミノデキストラン、又はヒト血清アルブミン(HAS)である。請求項20又は21に記載の複合体。

【請求項23】 請求項1～22のいずれか1項に記載の複合体を含んで成る医薬組成物。

【請求項24】 抗腫瘍作用を有する請求項23に記載の医薬組成物。

【請求項25】 請求項1～23のいずれか1項に記載の複合体を含んで成る診断用組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は医療の分野に属し、抗組織因子抗体を含んで成る複合体に関する。

【0002】

【従来の技術】 現在まで、血管内皮細胞を広く認識するマーカーとしてはCD31、CD36、Hlex eumpeaus laaglutinin (HxA-1)、また一般に活性化され大型化した血管内皮細胞に発現されるマーカーとしてはvon Willebrand factor (vWF)、ICAM-1 (CD54)、E-selectinが知られている。

【0003】 一方、腫瘍組織内に存在する血管内皮細胞(腫瘍血管内皮細胞)には正常組織では発現していない特異的な抗原を発現していることが推察されており、現在まで様々な腫瘍血管内皮細胞を認識するE-9抗体

(Wang, J.M. et al., Int. J.Cancer (1993) 54, 36)、抗F85 (endosialin) 抗体 (Ratnik, W.J. Proc. Natl. Sci. USA (1992) 89, 10832)、H4/18抗体 (Cotran, R.S. et al., J. Exp.Med. (1986) 164, 661)、QBEND/10抗体 (Ramani, P. et al., Histopathology (1990) 17, 237)、FN4/FN3抗体 (Schlingemann, R.O. et al., Amer. J.Pathol. (1991) 138, 1335)、BM120抗体 (Schlingemann, R.O. et al., Amer. J. Pathol. (1991) 138, 1335)、EN7/44抗体 (Hagemeyer, H.H. et al., Int. J. Cancer (1986) 38, 481)、PAL-E抗体 (Schlingemann, R.O. et al., Amer. J. Pathol. (1991) 138, 1335)、HEL 1抗体 (Gouqis, A. et al., J.Immunol. (1988) 141, 1934)、TEC4、TEC11抗体 (Ihorpe, P.C. et al., Am. Assoc. Cancer Res. (abstract) (1994) 35, 379)等のモノクローナル抗体が報告さ

れてきた。しかしながら、腫瘍血管内皮細胞を標的とする薬物のキャリアーとして上市されたモノクローナル抗体は未だ存在しない。

【0004】 組織因子は血液凝固の開始に重要な役割を果たしていることで知られており、播種性血管内凝固症候群(DIC)にかかわる重要な因子の一つと考えられている。一方、血管新生因子であるVEGF (Zucker, S., et al., Int. J. Cancer, 75, 780-786, 1998)や TGF- β (Vrana, J. A., et al., Cancer Res., 56, 5063-5070, 1996)、TNF- α (Zhang, Y, et al., J. Clin. Invest., 97, 2213-2224, 1996)、IL-1等のサイトカインによって血管内皮細胞に組織因子が誘導されることが報告され、近年、組織因子は血管新生に関わる因子の一つと考えられるようになってきている (Koomagi, R, Volm, M., Int. J. Cancer, 79, 19-2, 1998)。

【0005】 さらに、免疫組織染色にて良性乳腺腫瘍患者の腫瘍組織管腔形成血管内皮では組織因子発現が陰性であったのに対して、乳癌患者の癌組織の腫瘍血管内皮の組織因子発現が陽性 (Contrino, J., et al., Nature Medicine, 2, 209-215, 1996)されている。また、多くのヒト腫瘍細胞株および腫瘍より凝固能 (procoagulant assay, PCA) を指標にして組織因子活性が報告 (Edwards, R. L., et al., Thrombosis and Haemostasis, 69, 205-213, 1993) されており、組織因子を癌抗原としても利用可能であると考えられる。

【0006】 従って、抗組織因子抗体は腫瘍血管内皮あるいは組織因子を発現している腫瘍に対して特異的な薬物キャリアーとなる可能性があると考えられる (WO94/05328)。しかしながら、抗組織因子抗体がインターナライズして薬物キャリアーとして、薬物を腫瘍血管内皮細胞内に送達させ、抗腫瘍効果を発現させることが可能か否かは知られていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、抗組織因子抗体のインターナライゼーションを利用して抗腫瘍剤等を腫瘍細胞または腫瘍血管内皮細胞に導入し、腫瘍細胞の増殖を阻害するための新規な手段を提供しようとするものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記の課題を解決するため、種々研究した結果、抗ヒト組織因子抗体とトキシン複合体が、組織因子を細胞表面に発現しているヒト癌細胞に対して極めて低濃度で蛋白質合成阻害効果を示すこと、さらに、抗組織因子抗体は組織因子の凝固能に関する中和活性の有無にかかわらず、そのトキシン複合体が、組織因子を細胞表面に発現しているヒト癌細胞に対して殺細胞効果を示すことを確認することに成功し、その結果、抗組織因子抗体が組織因子を発現する細胞にインターナライズ (Internalize) し、その際に該抗体に連結した他の物質を該物質に導入することが

できること、および抗組織因子抗体は組織因子の中和活性によらず目的を達成できることを発見し、本発明を完成した。

【0009】従って、本発明は、組織因子に対する抗体（抗組織因子抗体）又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤とを連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片とトキシンとを連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるヒト組織因子に結合する抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤またはトキシンとを連結して成る複合体を提供する。

【0010】本発明はまた、組織因子に対する抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤またはトキシンとを連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、抗組織因子モノクローナル抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤またはトキシンとを連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、抗原結合能を有するその断片と化学療法剤またはトキシンとを連結して成る複合体を提供する。

【0011】本発明はまた、再構成ヒト抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤またはトキシンとを連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、再構成ヒト抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤またはトキシンとを連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、抗組織因子抗体又はその抗原結合活性を有するFab, F(ab')₂, scFv, (scFv)₂と化学療法剤またはトキシンとを連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、組織因子に対する抗体又は抗原結合能を有するその断片と抗腫瘍剤とを連結して成る複合体を提供する。

【0012】本発明はまた、組織因子に対する抗体又は抗原結合能を有するその断片と、メルファラン (Melphalan)、シスプラチン (Cisplatin)、カルボプラチン (Carboplatin)、マイトマイシンC (Mitomycin C)、アドリアマイシン (Adriamycin; Doxorubicin)、ダウノルビシン (Daunorubicin)、ブレオマイシン (Bleomycin)、ネオカルチノスタチン (Neocarzinostatin)、メトトレキサート (Methotrexate)、5-フルオロウリジン (5-Fluorouridine)、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン (5-Fluoro-2'-deoxyuridine)、シトシンアラビノシド (Cytosine arabinoside)、アミノプテリン (Aminopterin)、ビンクリスチン (Vincristine)、又はビンデシン (Vindesine) とを連結して成る複合体を提供する。

【0013】本発明はまた、組織因子に対する抗体又は抗原結合能を有するその断片とサイトカインとを連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、組織因子に対する抗体又は抗原結合能を有するその断片とインターロイキン-2 (IL-2)、腫瘍壊死因子α (TNF-α)、インタ

ーフェロン (IFN) とを連結して成る複合体を提供する。

【0014】本発明はまた、組織因子に対する抗体又は抗原結合能を有するその断片とジフテリアトキシンA鎖 (Diphtheria toxin A chain)、シュードモナスエンドトキシン (Pseudomonas endotoxin)、リシンA鎖 (Ricin A chain)、無糖鎖リシンA鎖 (Deglycosylated ricin A chain)、A鎖 (A chain)、ゲロニン (Gelolin)、ボークウィード抗ウィルス蛋白 (PAP-s; Pokeweed anti viral protein from seeds)、ブリオジン (Bridoin)、サボリン (Saporin)、モモルジン (Momordin)、モモルコキン (Momorcochin)、ジアンシン32 (Dianthin 32)、ジアンシン30 (Dianthin 30)、モデッシン (Modestcin)、ビスカミン (Viscumin)、ボルケシン (Volkesin)、ドデカンドリン (Dodecandrin)、トリチン (Tritin)、ルフオン (Luffin) 又はトリコキリン (Trichokirin) とを連結して成る複合体を提供する。

【0015】本発明はまた、抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤とをリンカーにより連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片とトキシンとをリンカーにより連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、ヒト組織因子に結合する抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤またはトキシンとをリンカーにより連結して成る複合体を提供する。

【0016】本発明はまた、組織因子に対する抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤またはトキシンとをリンカーにより連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、抗組織因子モノクローナル抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤またはトキシンとをリンカーにより連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、抗組織因子抗体 (IFO No. 50382) 又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤またはトキシンとをリンカーにより連結して成る複合体を提供する。

【0017】本発明はまた、再構成ヒト抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤またはトキシンとをリンカーにより連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、再構成ヒト抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤またはトキシンとをリンカーにより連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、抗組織因子抗体又はその抗原結合活性を有するFab, F(ab')₂又はscFvと化学療法剤またはトキシンとをリンカーにより連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、組織因子に対する抗体又は抗原結合能を有するその断片と抗腫瘍剤とをリンカーにより連結して成る複合体を提供する。

【0018】本発明はまた、組織因子に対する抗体又は抗原結合能を有するその断片と、メルファラン (Melphalan)、シスプラチン (Cis-platinum)、カルボプラチン (Carboplatin)、マイトマイシンC (Mitomycin C)、アドリアマイシン (Adriamycin; Doxorubicin)、ダウノ

ルビシン (Daunorubicin)、ブレオマイシン (Bleomycin)、ネオカルチノスタチン (Neocarzinostatin)、メトトレキサート (Methotrexate)、5-フルオロウリジン (5-Fluorouridine)、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン (5-Fluoro-2'-deoxyuridine)、シトシンアラビノシド (Cytosine arabinoside)、アミノプテリン (Aminopterin)、ビンクリスチン (Vincristine)、又はビンデシン (Vindesine) とをリンカーにより連結してなる複合体を提供する。

【0019】本発明はまた、組織因子に対する抗体又は抗原結合能を有するその断片とサイトカインとをリンカーにより連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、組織因子に対する抗体又は抗原結合能を有するその断片とインターロイキン-2 (IL-2)、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、インターフェロン (IFN) とをリンカーにより連結して成る複合体を提供する。

【0020】本発明はまた、組織因子に対する抗体又は抗原結合能を有するその断片とジフテリアトキシンA鎖 (Diphtheria toxin A chain)、シュードモナスエンドトキシン (Pseudomonas endotoxin)、リシンA鎖 (Ricin A chain)、無糖鎖リシンA鎖 (Daglycosylated ricin A chain)、A鎖 (A chain)、ゲロニン (Geloin)、ポークウィード抗ウイルス蛋白 (PAP-s; Pokeweed antiviral protein from seeds)、ブリオジン (Briodin)、サポリン (Saporin)、モモルジン (Momordin)、モモルコキン (Momorcochin)、ジアンシン32 (Dianthin 32)、ジアンシン30 (Dianthin 30)、モデッシン (Modccin)、ビスカミン (Viscumin)、ボルケシン (Volkesin)、ドデカンドリン (Dodecandrin)、トリチン (Trichitin)、ルフィン (Luffin) 又はトリコキリン (Trichokirin) とをリンカーにより連結して成る複合体を提供する。

【0021】本発明はまた、抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤とを中間支持体により連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片とトキシンとを中間支持体により連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、配列番号7に記載のアミノ酸配列からなるヒト組織因子に結合する抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤またはトキシンとを中間支持体により連結して成る複合体を提供する。

【0022】本発明はまた、抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤またはトキシンとを中間支持体により連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、再構成ヒト抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤またはトキシンとを中間支持体により連結して成る複合体を提供する。

【0023】本発明はまた、再構成ヒト抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤またはトキシンとを中間支持体により連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、抗組織因子抗体又はその抗原結合活性を有するFab, F(ab')₂, scFv又はsc(Fv)と化学療法剤またはトキシンとを中間支持体により連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、組織因子に対する抗体又は抗原結合能を有するその断片と抗腫瘍剤とを中間支持体により連結して成る複合体を提供する。

【0024】本発明はまた、組織因子に対する抗体又は抗原結合能を有するその断片と、メルファラン (Melphalan)、シスプラチン (Cis-platinum)、カルボプラチン (Carboplatin)、マイトマイシンC (Mitomycin C)、アドリアマイシン (Adriamycin; Doxorubicin)、ダウノルビシン (Daunorubicin)、ブレオマイシン (Bleomycin)、ネオカルチノスタチン (Neocarzinostatin)、メトトレキサート (Methotrexate)、5-フルオロウリジン (5-Fluorouridine)、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン (5-Fluoro-2'-deoxyuridine)、シトシンアラビノシド (Cytosine arabinoside)、アミノプテリン (Aminopterin)、ビンクリスチン (Vincristine)、又はビンデシン (Vindesine) とを中間支持体により連結してなる複合体を提供する。

【0025】本発明はまた、組織因子に対する抗体又は抗原結合能を有するその断片とサイトカインとを中間支持体により連結して成る複合体を提供する。本発明はまた、組織因子に対する抗体又は抗原結合能を有するその断片とインターロイキン-2 (IL-2)、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、インターフェロン (IFN) とを中間支持体により連結して成る複合体を提供する。

【0026】本発明はまた、組織因子に対する抗体又は抗原結合能を有するその断片とジフテリアトキシンA鎖 (Diphtheria toxin A chain)、シュードモナスエンドトキシン (Pseudomonas endotoxin)、リシンA鎖 (Ricin A chain)、無糖鎖リシンA鎖 (Daglycosylated ricin A chain)、A鎖 (A chain)、ゲロニン (Geloin)、ポークウィード抗ウイルス蛋白 (PAP-s; Pokeweed antiviral protein from seeds)、ブリオジン (Briodin)、サポリン (Saporin)、モモルジン (Momordin)、モモルコキン (Momorcochin)、ジアンシン32 (Dianthin 32)、ジアンシン30 (Dianthin 30)、モデッシン (Modccin)、ビスカミン (Viscumin)、ボルケシン (Volkesin)、ドデカンドリン (Dodecandrin)、トリチン (Trichitin)、ルフィン (Luffin) 又はトリコキリン (Trichokirin) とを中間支持体により連結して成る複合体を提供する。

【0027】本発明はまた、上記に記載した複合体を含んで成る医薬組成物を提供する。本発明はまた、上記に記載した複合体を含んで成る抗腫瘍作用を有する医薬組成物を提供する。

【0028】

【発明の実施の形態】本発明において使用される抗組織因子抗体に対する抗原は、すでに知られている。本発明に使用される抗組織因子抗体を得るための抗原としては、組織因子を発現している細胞または、遺伝子組換えによって組織因子を発現させた細胞（大腸菌等）でもよく、また、そのような細胞から精製又は半精製組織因子蛋白質でもよい。このような細胞としては、例えば従来技術の項に前記した種々の細胞株を使用することができる。

【0029】本発明に使用される抗体は、ポリクローナル抗体でも、モノクローナル抗体でもよいが、特にモノクローナル抗体が好ましい。モノクローナル抗体は、基本的に公知技術を使用し、以下のようにして作成できる。すなわち組織因子もしくは組織因子発現細胞、例えばヒト膀胱癌由来細胞J82株を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作成できる。

【0030】感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に作用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはマウス、ラット、ハムスター、ウサギ等が使用される。感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline)や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものをもとにより通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に1～2日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

【0031】このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3-
(P3x63Ag8.653) (J. Immunol. 123 : 1548, 1978), p3-
U1 (Current Topics in Micro-biology and Immunology 81 : 1-7, 1978), NS-1 (Eur. J. Immunol. 6 : 511-519, 1976), NPC-11 (Cell, 8 : 405-415, 1976), SP2/0 (Nature, 276 : 269-270, 1978), F' O (J. Immunol. Methods, 35 : 1-21, 1980), S194 (J. Exp. Med. 148 : 313-323, 1978), R210 (Nature, 277 : 131-133, 1979)等が好適に使用される。

【0032】前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融

合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Milsteinら, Methods Enzymol. 73 : 3-46, 1981)等に準じて行うことができる。より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、センダイウィルス(HVJ)等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

10 【0033】免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1～10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清(FCS)等の血清補液を併用することもできる。

【0034】細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1000～6000程度のPEG溶液を通常、30～60% (w/v)の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞（ハイブリドーマ）が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、速心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合等を除去できる。

【0035】当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプ
テリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行われる。

【0036】また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原蛋白質または抗原発現細胞で感作し、感作Bリンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、特定の抗原または抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平159878参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原または抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号WO93-12227, WO92-03918, WO94-02602, WO94-25585, WO96-34096, WO96-33735, 米国特許番号US5545806参照）。

【0037】このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体培養中で長期

保存することが可能である。当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大량生産に適している。

【0038】本発明には、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子を抗体産生細胞、例えばハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる(例えば、Carl, A.K., Borrebaeck, Janes, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照)。

【0039】具体的には、目的とする抗体を産生するハイブリドーマや抗体を産生する免疫細胞、例えば悪作リンパ球等を癌遺伝子(oncogene)等により不死化させた細胞から、抗体の可変領域(V領域)をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えばグアニジン超遠心法(Chirwin, J.M.ら、Biochemistry(1979) 18, 5294-5299)、AGPC法(Chmczynski, P.ら、(1987) 162, 156-159)等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia製)等を使用してmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia製)を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

【0040】得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-AmplifINDER RACE Kit (Clontech製)およびPCRを用いた5'-RACE法(Irshman, M.A.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A.ら、Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)を使用することができる。得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作成し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、デオキシ法により確認する。

【0041】目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域(C領域)をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでよい。本発明で使用される抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサ

ー/プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

【0042】抗体遺伝子の発現は、抗体の重鎖(H鎖)または軽鎖(L鎖)を別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで宿主を形質転換させてもよい(国際特許出願公開番号WO94/11523参照)。本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ(Chimeric)抗体、ヒト型化(humanized)抗体又はヒト化抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

【0043】キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる(欧州特許出願公開番号EP125023、国際特許出願公開番号WO95/14041参照)。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

【0044】ヒト型化抗体は、再構成(reshaped)ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域(CDR; complementarity determining region)をヒト抗体のCDRへ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている(欧州特許出願公開番号EP125023、国際特許出願公開番号WO95/14041参照)。

【0045】具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域(FR; framework region)を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる(欧州特許出願公開番号EP239400、国際特許出願公開番号WO95/14041参照)。

【0046】CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、CDRが良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するように抗体のV領域のFRのアミノ酸を置換してもよい(Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。キメラ抗体と、ヒト型化抗体には、ヒト抗体C領域が使用される。好ましいヒト抗体C領域としては、C γ が挙げられ、例えば、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。

【0047】キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物抗体由来のV領域とヒト抗体由来のC領域からなり、ヒト型化抗

体はヒト以外の哺乳動物抗体由来のCDRとヒト抗体由来のFRおよびC領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明に使用される抗体として有用である。本発明で使用される抗体は、本発明に好適に使用され得るかぎり、抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、FvまたはシングルチェーンFv(scFv)が挙げられる。scFvはH鎖とL鎖のドVを適当なリンカーで連結させた構造を有する。また、抗体を構成するアミノ酸配列の一つまたは複数個のアミノ酸残基が変異、置換、欠失または挿入を受けた抗体も本発明において抗体として使用される。

【0048】これらの抗体断片を得るためには、抗体を酵素、例えば、パバイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976, Better, M. & Horwitz, A.H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663, Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669, Bird, R.E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 参照）。

【0049】scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域を連結することにより得られる（国際特許出願公開番号WO88/09344, WO95/14041参照）。このscFvにおいては、H鎖V領域とL鎖V領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリンカーを介して連結される（Huston, J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883）。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、上記抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる（米国特許5525491 参照）。

【0050】scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖または、H鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖または、L鎖V領域をコードするDNAを鋳型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードするDNAおよびその両端を各々H鎖、L鎖と連結するように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

【0051】また、一旦scFvをコードするDNAが作製されれば、それらを含有する発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができる。また、その宿主を用いて常法に従って、scFvを得ることができる。これら抗体断片は、前述

のようにその遺伝子を取得し発現させ、宿主により產生させることができる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体断片も包含される。これらの抗体断片は、抗体分子に比べて分子量が小さいため、生体において組織移行性が優れており、抗体と同様の機能を有する分子として有用である。

【0052】抗体修飾物として、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。抗体になされる修飾とは、化学的結合を導入することによる修飾であってもよいし、抗体のアミノ酸配列になされる修飾であってもよい。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

【0053】前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、抗体を取得することができる。哺乳類細胞を使用する場合、常用される有用なプロモーター/エンハンサー、発現される抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター/エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター/エンハンサー(human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer)を挙げることができる。

【0054】また、その他に本発明で用いられる抗体発現に使用できるプロモーター/エンハンサーとして、レトロウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40(SV40)等のウイルスプロモーター/エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1α(HEF1α)などの哺乳類細胞由来のプロモーター/エンハンサーを用いればよい。例えば、SV40プロモーター/エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法(Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1αプロモーター/エンハンサーを使用する場合、Mizushimaらの方法(Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)に従えば容易に実施することができる。

【0055】大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法(Nature (1998) 341, 544-546; HASTB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法(Science (1988) 240, 1041-1043)に従えばよい。

【0056】抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列(Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379)を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体

を分離した後、抗体の構造を適切にフォールド (refold) のして使用する (例えば、国際特許出願公開番号WO 96-30394、日本特許出願公告特公平7-93879を参照)。

【0057】複製起源としては、SV40ポリオマウイルス、アデノウイルス、ウシバビロマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることができる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、人腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecopt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。本発明で使用される抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができる。抗体製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

【0058】真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えばCHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、(2) 両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは(3) 昆虫細胞、例えばsf9、sf21、Tn5が知られている。CHO細胞としては、特にDHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220)やCHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275)を好適に使用することができる。

【0059】植物細胞としては、Nicotiana tabacum由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えばサッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えばアスペルギルス (Aspergillus) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) などが知られている。原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli)、枯草菌が知られている。

【0060】これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞をin vitroで培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、in vivoにて抗体を産生してもよい。

【0061】一方、in vivoの生産系としては、動物を

使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物または植物に抗体遺伝子を導入し、動物または植物の体内で抗体を産生させ、回収する。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

【0062】例えば、抗体遺伝子をヤギβカゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい。 (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

【0063】また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。さらに植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをAgrobacterium tumefaciensのようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばNicotiana tabacumに感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-135)。

【0064】上述のようにin vitroまたはin vivoの産生系にて抗体を産生する場合、抗体のH鎖またはL鎖をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい (国際特許出願公開番号WO94/11523参照)。宿主への発現ベクターの導入方法としては、公知の方法、例えばリン酸カルシウム法 (Virology (1973) 52, 456-467) やエレクトロポレーション法 (EMBO J. (1982) 1, 841-845) 等が用いられる。

【0065】前記のように産生、発現された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製は、通常の蛋白質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選

状、組み合わせれば抗体を分離、精製することができる (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

【0066】アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えばプロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。プロテインAカラムに用いる担体として、例えばHyper D, PORUS, Sepharose ト.ト. (Pharmacia)等が挙げられる。アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えばイオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。

【0067】これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC, HPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。得られた抗体の濃度測定は、吸光度の測定または酵素結合免疫吸着検定法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、得られた抗体をPBSで適当に希釈した後、280nmの吸光度を測定する。例えば、ヒト抗体の場合、1mg/mlを1.3500として算出すればよい。

【0068】また、ELISAによる場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M重炭酸緩衝液 (pH9.6)で1μg/mlに希釈したヤブ抗ヒトIgG (TACC製)100μlを96穴プレート (Nunc製)に加え、4℃で一晩インキュベートし、抗体を固着化する。ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用する抗体または抗体を含むサンプル、あるいは濃度標準品として既知の濃度のヒトIgG (CAPPEL製)100μlを添加し、室温にて1時間インキュベートする。

【0069】洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG (BIO SOURCE製)100μlを加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベートの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad製)を用いて405nmでの吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。また、抗体の濃度測定には、BIAcore (Pharmacia製)を使用することができる。

【0070】本発明で使用する抗体の抗原結合活性の評価は、通常知られた方法、例えばELISA, EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法)あるいは蛍光抗体法を用いることができる (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。上記抗体の活性評価には、BIAcore (Pharmacia製)を使用することができる。本発明において、「トキシン」とは、微生物、動物又は植物由来の細胞毒性を示す種々の蛋白質やポリペプチド等を意

味する。例えば既知のトキシンとして、次のものを挙げることができる。

【0071】ジフテリアトキシンA鎖 (Diphtheria toxin A Chain) (Langone J.J., et al., Methods in Enzymology, 93, 307-308, 1983)、シュードモナスエンドトキシン (Pseudomonas Endotoxin) (Nature Medicine, 2, 350-353, 1996)、リシンA鎖 (Ricin A Chain) (Hulten R.J., et al., J. Biol. Chem., 261, 5314-5319, 1986; Sivam G., et al., Cancer Res., 47, 3169-3173, 1987; Cumber A.J. et al., J. Immunol. Methods, 135, 15-24, 1990; Wawrzynczak E.J., et al., Cancer Res., 50, 7519-7562, 1990; Gheeeite V., et al., J. Immunol. Methods, 142, 223-230, 1991)；

【0072】無糖鎖リシンA鎖 (Deglycosylated Ricin A Chain) (Thorpe P.E., et al., Cancer Res., 47, 5924-5931, 1987)；A鎖 (A Chain) (Wawrzynczak E.J., et al., Br. J. Cancer, 66, 361-366, 1992; Wawrzynczak E.J., et al., Cancer Res., 50, 7519-7562, 1990; Sivam G., et al., Cancer Res., 47, 3169-3173, 1987; Thorpe P.F., et al., Cancer Res., 47, 5924-5931, 1987)；ゲロニン (Geloin) (Sivam G., et al., Cancer Res., 47, 3169-3173, 1987; Cumber A.J. et al., J. Immunol. Methods, 135, 15-24, 1990; Wawrzynczak E.J., et al., Cancer Res., 50, 7519-7562, 1990; Bolognesi A., et al., Clin. exp. Immunol., 89, 341-346, 1992)；

【0073】ポークウィード抗ウイルス蛋白 (PAPs; Pokeweed anti-viral protein from seeds) (Bolognesi A., et al., Clin. exp. Immunol., 89, 341-346, 1992)；プリオジン (Priodoin) (Bolognesi A., et al., Clin. exp. Immunol., 89, 341-346, 1992)；サボリン (Saporin) (Bolognesi A., et al., Clin. exp. Immunol., 89, 341-346, 1992)；

【0074】モモルジン (Mmordin) (Cumber A.J., et al., J. Immunol. Methods, 135, 15-24, 1990; Wawrzynczak E.J., et al., Cancer Res., 50, 7519-7562, 1990; Bolognesi A., et al., Clin. exp. Immunol., 89, 341-346, 1992)；モモルコキン (Momorcochin) (Bolognesi A., et al., Clin. exp. Immunol., 89, 341-346, 1992)；ジアンシン32 (Dianthin 32) (Bolognesi A., et al., Clin. exp. Immunol., 89, 341-346, 1992)；ジアンシン30 (Dianthin 30) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter 195, 1-8, 1986)；

【0075】モデッシン (Modeccin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter 195, 1-8, 1986)；ビスカミン (Viscumin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter 195, 1-8, 1986)；ボルケシン (Volkesin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter 195, 1-8, 1986)；ドデカン ドリン (Dodecandrin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter 195, 1-8, 1986)；

【0076】トリチン (Iritin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter 195, 1-8, 1986); ルフィン (Luffin) (Stirpe F., Barbieri L., FEBS letter 195, 1-8, 1986); トリコキリン (Trichokirin) (Casellas P., et al., Eur. J. Biochem. 176, 581-588, 1988; Bolognesi A., et al., Clin. exp. Immunol., 89, 341-346, 1992).

【0077】抗腫瘍剤としては、メルファラン (Melphalan) (Rowland G.F., et al., Nature 255, 487-488, 1975); シスプラチン (Cis-platinum) (Hurwitz E. and Haimovich J., Method In Enzymology 178, 369-375, 1986; Schechter B., et al., Int. J. Cancer 48, 167-172, 1991); カルボプラチン (Carboplatin) (Ota, Y., et al., Asia-Oceania J. Obstet. Gynaecol. 19, 449-457, 1993); マイトマイシン C (Mitomycin C) (Nozuchi, A., et al., Bioconjugate Chem. 3, 132-137, 1992);

【0078】アドリアマイシン (Adriamycin (Doxorubicin)) (Shih, L.B., et al., Cancer Res. 51 4192-4198, 1991; Zhu, Z., et al., Cancer Immunol. Immunother 40, 257-267, 1995; Trail, P.A., et al., Science 261, 212-215, 1993; Zhu, Z., et al., Cancer Immunol. Immunother 40, 257-267, 1995; Kondo, Y., et al., Jpn. J. Cancer Res. 86 1072-1079, 1995; Zhu, Z., et al., Cancer Immunol. Immunother 40, 257-267, 1995; Zhu, Z., et al., Cancer Immunol. Immunother 40, 257-267, 1995);

【0079】ダウノルビシン (Daunorubicin) (Dillman, R.O. et al., Cancer Res. 48, 6097-6102, 1988; Hudecz, F., et al., Bioconjugate Chem. 1, 197-204, 1990; Takeda Y. et al., J. Natl. Cancer Inst. 75, 721-729, 1984); プレオマイシン (Blomycin) (Manabe, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 115, 1009-1014, 1983); ネオカルチノスタチン (Neocarzinostatin) (Kitamura K., et al., Cancer Immunol. Immunother 36, 177-184, 1993; Yamauchi T., et al., Jpn. J. Cancer Res. 85, 167-171, 1994);

【0080】メトトレキサート (Methotrexate) (Kralevic, J., et al., Cancer Immunol. Immunother 29, 293-302, 1989; Kulkarni, P.N., et al., Cancer Res. 41, 2700-2706, 1981; Shin, L.B., et al., Int. J. Cancer 41, 832-839, 1988; Gamett M.C., et al., Int. J. Cancer 31, 661-670, 1983); 5-フルオロウリジン (5-Fluorouridine) (Shin, L.B., Int. J. Cancer 46, 1101-1106, 1990); 5-フルオロ-2'-デオキシウリジン (5-Fluoro-2'-deoxyuridine) (Goerlach A., et al., Bioconjugate Chem. 2, 96-101, 1991);

【0081】シトシンアラビノシド (Cytosine arabinoside) (Hurwitz E., et al., J. Med. Chem. 28, 137-140, 1985); アミノプテリン (Aminopterin) (Kanellos

J., et al., Immunol. Cell. Biol. 65, 483-493, 1987); ビンクリスチン (Vincristine) (Johnson J.R., et al., Br. J. Cancer 42, 17, 1980); ビンデシン (Vindesine) (Johnson J.R., et al., Br. J. Cancer 44, 472-475, 1981); などが挙げられる。

【0082】抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片とトキシン又は化学療法剤が、それら自身が有する連結基を介して直接結合される場合の連結基は、SH基を用いたジスルフィド結合が挙げられる。抗体のFc領域の分子内ジスルフィド結合を例えばジチオトレイトール等にて還元し、トキシンのジスルフィド結合を同様に還元して、両者をジスルフィド結合にて連結する。連結前に例えばエルマン試薬 (Ellman's reagent) にて抗体かトキシンのいずれか一方を活性化し両者をジスルフィド結合させる。

【0083】抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片とトキシン又は化学療法剤が、それら自身が有する連結基を介して直接結合される場合の連結基は、例えばダウノルビシン (Hurwitz, E. et al., Cancer Res. 35, 1175-1181, 1975)、アドリアマイシン (ドキシソルビシン; Mohamed, G. et al., Proc. A.A.C.R. 27, 317, 1986) (Kulkarni, P.N. et al., Cancer Res. 41, 2700-2706, 1981) 活性エステル法 (N-hydroxysuccinimide法) 活性エステル法 (Kulkarni, P.N. et al., Cancer Res. 41, 2700-2706, 1981 Mixed anhydride Mixed anhydride Burnstein, S. et al., J. Med. Chem. 20, 950-952, 1977) ジアゾ反応により連結される化学療法剤としては、例えばMTX (De Carvalho, S. et al., Nature (London) 202, 255-258, 1964) が使用される。

【0084】連結基としてアミノ基、カルボキシル基、メルカプト基等を2個以上有する化合物が挙げられ、抗体又は抗原結合能を有するその断片およびトキシン又は酵素が有するカルボキシル基又はアミノ酸と、リンカーが提供するカルボキシル基、アミノ酸、メルカプト基等との間に形成されるエステル結合、アミド結合、チオエステル結合等により連結される。例えば次の物質が使用される。

【0085】N-スクシニミジル 3-(2-ピリジルジチオ) プロピオネート (SPDP: N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate) (Wawrzynczak E.J., et al., Cancer Res., 50, 7519-7562, 1990; Thorpe P. E., et al., Cancer Res., 47, 5924-5931, 1987); LC-スクシニミジル 3-(2-ピリジルジチオ) プロピオネート (LC-SPDP: LC-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate) (Hermanson G.T., BIOCONJUGATE Techniques, 230-232, 1996);

【0086】スルホ-LC-スクシニミジル 3-(2-ピリジルジチオ) プロピオネート (Sulfo-LC-SPDP: Sulfo-LC-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate) (Hermanson G.T., BIOCONJUGATE Techniques, 230-232, 1996);

32, 1996); N-スクシニミジル 3-(2-ピリジリジチオ)ブチレート (SPDB: N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) butyrate) (Wawrzynczak E.J., et al., *B. J. Cancer*, 66, 361-366, 1992); スクシニミジロキシカルボニル- α -(2-ピリジリジチオ)トルエン (SMPT: Succinimidylloxycarbonyl- α -(2-pyridyldithio) toluene) (Thorpe P.E., et al., *Cancer Res.*, 47, 5924-5931, 1987);

【0087】LC-スクシニミジロキシカルボニル- α -(2-ピリジリジチオ)トルエン (LC-SMPT: LC-Succinimidylloxycarbonyl- α -(2-pyridyldithio) toluene) (Hermanson G.T., *BIOCONJUGATE Techniques*, 232-235, 1996); スルホ-LC-スクシニミジロキシカルボニル- α -(2-ピリジリジチオ)トルエン (Sulfo-LC-SMPT: Sulfo-LC-Succinimidylloxycarbonyl- α -(2-pyridyldithio) toluene) (Hermanson G.T., *BIOCONJUGATE Techniques*, 232-235, 1996);

【0088】スクシニミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート (SMPB: Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl) butyrate) (Hermanson G.T., *BIOCONJUGATE Techniques*, 242-243, 1996); スルホ-スクシニミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート (Sulfo-SMPB: Sulfo-Succinimidyl 4-(p-maleimidophenyl) butyrate) (Hermanson G.T., *BIOCONJUGATE Techniques*, 242-243, 1996); m-マレイミドベンゾイル-N-ハイドロキシスクシニミドエステル (MBS: m-Maleimido benzoyl N hydroxysuccinimide ester) (Hermanson G.T., *BIOCONJUGATE Techniques*, 237-238, 1996);

【0089】スルホ-m-マレイミドベンゾイル-N-ハイドロキシスクシニミドエステル (Sulfo-MBS: Sulfo-m-Maleimido benzoyl N-hydroxysuccinimide ester) (Hermanson G.T., *BIOCONJUGATE Techniques*, 237-238, 1996); S-アセチルメルカプトスクシニクアミド (SMBSA: S Acetyl mercaptosuccinic anhydride) (Casellas P., et al., *Eur. J. Biochem.* 176, 581-588, 1988); ジメチル 3,3'-ジチオビスプロピオンニミデート (DTBP: Dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidate) (Casellas P., et al., *Eur. J. Biochem.* 176, 581-588, 1988); 2-イミノチオレタン (2-Iminothiolane) (Thorpe P.E., et al., *Cancer Res.*, 47, 5924-5931, 1987)。

【0090】中間支持体としては、ヘブチド、例えばポリ-L-グルタミン酸(PGA)、カルボキシメチルデキストラン、デキストラン、アミノデキストラン、アビジン・ビオチン、シス・アコニット酸、グルタミン酸ジヒドロリジド、ヒト血清アルブミン(HSA)等が用いられる。抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片は、組織因子抗原を発現している細胞にインターナライズすることができる。従って、抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片、リンカー、中間支持体連結された種々の

化学療法剤やトキシンは、抗組織因子抗体のインターナライゼーションと共に細胞に効率よく導入され、細胞内でそれらの薬理効果を発揮する。

【0091】従って、本発明の抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤またはトキシンを連結して成る複合体は、種々の化学療法剤又はトキシンを細胞に導入するための医薬組成物として有用である。組織因子は腫瘍細胞に広く分布しているから、本発明の医薬組成物は特に抗腫瘍作用のある医薬組成物として有用である。この効果は、例えば抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片とトキシンを含んで成る本発明の複合体、例えばイムノトキシン又は遊離のトキシンを組織因子を発現している細胞に添加した場合、前者において殺細胞効果が高かったことにより証明された。

【0092】本発明の抗組織因子抗体又は抗原結合能を有するその断片と化学療法剤またはトキシンとを連結して成る複合体または該複合体を含んで成る医薬組成物は、経口的あるいは非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。非経口的投与としては、例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射を選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。本発明の複合体または該複合体を含んで成る医薬組成物は、腫瘍に既に悩まされる患者に、症状を治癒するか、あるいは少なくとも部分的に阻止するために十分な量で投与される。

【0093】また、本発明の複合体または該複合体を含んで成る診断用組成物は、腫瘍に既に悩まされる患者の体内の腫瘍の局在をイメージングするために投与される。例えば、有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.01mgから100mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1~1000mg、好ましくは5~50mgの投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の複合体または該複合体を含んで成る医薬組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。また、投与期間は、患者の年齢、症状により適宜選択することができる。本発明の複合体または該複合体を含んで成る医薬組成物は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

【0094】このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリンアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン(HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトー

ス、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。

【0095】使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。本発明はまた、本発明の複合体と他の薬剤、生物学的製剤や合成医薬製剤などとの、同時もしくは逐次の併用投与をも包含する。他の薬剤としては、抗炎症薬や抗アレルギー薬、抗血小板薬、他の抗腫瘍薬の中から選ばれる。

【0096】

【実施例】次に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1. 抗組織因子抗体とグロニンとの複合体（イムノトキシン）の作製

本発明の抗ヒト組織因子モノクローナル抗体と植物（*Gelonium multiflorum*）の種子由来の蛋白質合成阻害活性を有するトキシンであるグロニン（gelonin, Inland Laboratories社）との複合体をIhrope, P.C. et al., Cancer Res. (1987) 47, 5924-5931 の方法を用いて作製した。同様にコントロール抗体（MOPC-31C）（ATCC CCL-1 30(Yoshida T.H. et al., J.Natl.Cancer Inst.(1968)41, 1083-1097) とグロニンとの複合体を作製した。

【0097】1 mLの50mMリン酸ナトリウム-150 mM NaCl-5 mM EDTA (pH7.0) 緩衝液中に抗体2mgとそれに対して直前に0.01 mLのDMSOに溶解した3倍モル量のN-スクスニミジル 3-(2-ヒビリジルジチオ)プロピオネート（SPDP, Pierce社）を添加し、室温で1時間穏やかに攪拌して反応させた後、あらかじめ50 mMリン酸ナトリウム-150 mM NaCl-5 mM EDTA (pH7.0) 緩衝液で平衡化した脱塩カラムFast Desalting Column 10/10 (Pharmacia Biotech 社) により未反応のSPDPおよび塩類を除去してPDP基導入抗体を得た。

【0098】一方、1 mLの50 mMリン酸ナトリウム-150 mM NaCl-5 mM EDTA (pH7.0) 緩衝液中にグロニン1mgとそれに対して3倍モル量の2-イミノチオレーン（2-IT, Pierce 社）を添加し、室温で45分間穏やかに攪拌して反応させた後、あらかじめ50 mMリン酸ナトリウム-150 mM NaCl-5 mM EDTA (pH7.0) 緩衝液で平衡化した脱塩カラムFast Desalting Column 10/10 (Pharmacia Biotech社) により未反応の2-ITおよび塩類を除去して、SH基導入グロニンを得た。抗体とグロニンを結合させるため、PDP基導入抗体とSH基導入グロニンを混合してCentricon 10 (Amicon社) にて4度Cで5000 rpm、1時間遠心濃縮しておよそ0.5 mLにした後、4度Cで一晩静置した。

【0099】反応を終結させるため、ヨードアセトアミド（ナカライテスク社）を反応液に終濃度0.5%になるように添加し、室温で30分間穏やかに攪拌した。試薬類と未反応のグロニンを除去するため、反応液を4℃

で12000 rpm、10分間遠心分離した上清をゲル濾過カラムSuperdex 200 HR 10/30 (Pharmacia Biotech 社) で精製し、抗体とグロニンの複合体を含むフラクションを回収し、抗組織因子抗体とグロニンとの複合体サンプルとした。

【0100】実施例2. 抗組織因子抗体とグロニンとの複合体（イムノトキシン）のヒト膀胱癌細胞J82に対する蛋白質合成阻害効果

抗組織因子抗体とグロニンとの複合体とMOPC-31Cとグロニンとの複合体の各サンプルを、10% FCS含有RPMI-1640培地にて400 nMに調整して0.22 μmの孔径のフィルター（Millipore 社）により濾過滅菌した後、各サンプルを10倍希釈で3~5段階希釈した溶液を調製した。

【0101】ヒト膀胱癌細胞J82を10%ウシ胎児血清(FCS) 含有RPMI-1640培地（Gibco社）に懸濁し、組織培養用96穴培養プレート（Corning 社）に1穴当たり 2×10^3 細胞（75 μL）播き、37℃、5% CO₂ の条件下で8時間培養した。抗体とグロニンの複合体サンプルの希釈液を96穴培養プレート1穴当たりそれぞれ25 μL添加した。サンプル添加後48時間目に、10% FCS含有RPMI-1640培地を用いて10倍希釈した3-H-ロイシン（Amersham社、37 MBq/mL, Cat No. 18K636）を96穴培養プレートに1穴当たり10 μL添加した。37℃、5% CO₂ の条件下で更に20時間インキュベーションした後、培地を除去した。

【0102】Tryptsin/EDTA (sigma 社、Cat No. T-4049, lot No. 3387) を1穴当たり50 μL添加した。37℃、5% CO₂ の条件下で5分間インキュベーションした後、セルハーベスター（Micro96 HARVESTAR, SKA IKON industries 社Type No. 1057）にて、細胞をガラスフィルター（Printed Filter mat A, WALLAC社）に回収した。取り込まれた3-H-ロイシン放射活性の測定は、MicroBeta-1450 (WALLAC社、serial No. 4500162) にて行った。コントロール（培地のみで測定）の値を100%として抗体-グロニン複合体の蛋白質合成阻害活性を算出した。その結果を図1に示した。この結果、抗ヒト組織因子抗体とグロニン複合体は標的細胞特異的に蛋白質合成阻害効果を示すことが明らかになった。

【0103】実施例3. 組織因子の血液凝固能の中和活性を有する抗ヒト組織因子抗体および、中和活性を持たない抗ヒト組織因子抗体とグロニンとの複合体（イムノトキシン）によるヒト膀胱癌細胞J82に対する殺細胞効果

ヒト膀胱癌細胞J82を10%ウシ胎児血清(FCS) 含有RPMI-1640培地（Gibco社）に懸濁し、 2.67×10^4 細胞/mLに調製した細胞懸濁液を、組織培養用96穴培養プレート（Corning 社）に1穴当たり75 μL播き、37℃、5% CO₂ の条件下で6時間培養した。

【0104】抗ヒト組織因子モノクローナル抗体ATR

5から作製した抗ヒト組織因子抗体-グロニンとMOPC-31C-グロニンおよびグロニンの各サンプルを、10% FCS含有RPMI-1640培地に於て調製して0.22 μmの孔径のフィルター (Millipore 社) により濾過滅菌した溶液を調製した。各調製液を96穴培養プレート1穴当たり25 μL添加し、それぞれ終濃度を抗ヒト組織因子抗体-グロニン複合体およびMOPC-31C-グロニン複合体を100 nM、グロニンを10 μMとした。

【0105】サンプルを添加して71時間後にCell Titer 96 Aqueous One Solution Reagent (MTS 試薬, PROM EGA 社) を1穴当たり20 μL添加した。37°C、5% CO₂ 条件下で1.5時間インキュベーションした後、10% SDS溶液を1穴当たり25 μL添加して反応を止め、Microplate reader (Benchmark, Bio Rad 社) によりOD490~620 nmを測定した。その結果を図2に示した。この結果、抗ヒト組織因子モノクローナル抗体-グロニン複合体は標的細胞に対して殺細胞効果を示すことが明らかになった。

【0106】参考例。抗TFモノクローナル抗体の作製

1. ヒトTFの精製

ヒト胎盤からのTFの精製は、Itoらの方法 (Ito, T. ら, J. Biochem. 114, 691-696, 1993) に準じて行った。すなわち、ヒト胎盤を10 mM塩化ベンザミジン、1 mMフッ化フェニルメチルスルホニル、1 mMジイソプロピルフルオロフォスフェートおよび0.02% アジ化ナトリウムを含むトリス緩衝生理食塩液 (TBS, pH7.5) 中でホモジナイズ後、沈殿を冷アセトンで脱脂し、得られた脱脂粉末を2% Triton X-100を含む上記緩衝液に懸濁してTFを可溶化した。

【0107】この上清からConcanavalin A Sepharose 4B カラム (Pharmacia) および抗TF抗体を結合させたSepharose 4Bカラム (Pharmacia) を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行い、精製TFを得た。これを限外濾過膜 (HM-10, Amicon) で濃縮し、精製標品として4°Cで保存した。精製標品中のTF含量は、市販の抗TFモノクローナル抗体 (American Diagnostica) とポリクローナル抗体 (American Diagnostica) を組合せたSandwich ELISAで、組換え型TFを標準にして定量化した。また精製標品の純度は、4-20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEしたものを銀染色すること

【0108】2. 免疫とハイブリドーマの作製
精製ヒトTF (約70 ng/ml) を等用量のFreundの完全*

* アジュバント (Difco) と混合後、5週齢のBalb/c系雄性マウス (日本チャールスリバー) の腹部皮下に、TFとして10 μg/マウスとなるように免疫した。12、18及び25日にはFreundの不完全アジュバントと混合したTFを5 μg/マウスとなるように皮下に追加免疫し、最終免疫として32日にPBSで希釈したTF溶液を5 μg/マウスで腹腔内投与した。

【0109】最終免疫の3日後に4匹のマウスから脾細胞を調製し、細胞数で1/5のマウスミエローマ細胞株P3U1とポリエチレングリコール法を用いて融合させた。融合細胞を10%ウシ胎仔血清を含むRPMI-1640培地 (以下RPMI-培地とする) (Lifetech oriental) に懸濁し、96穴プレートに1匹のマウスにつき400穴 (約400個/穴) 播種した。融合後、1、2、3、5日目培地の半量をHAT (大日本製薬) およびcondimed HL (Boehringer Mannheim GmbH) を含むRPMI-培地 (以下HAT-培地とする) に交換することで、ハイブリドーマのHAT選択を行った。

【0110】下記のスクリーニング法で選択したハイブリドーマは2回の限界希釈を行うことでクローン化した。限界希釈は、96穴プレート2枚に一穴あたり0.8個の細胞を播種した。検鏡により単一コロニーであることが確認できた穴について、下記に示したTF結合活性とTF中和活性の測定を行いクローンを選択した。得られたクローンはHAT-培地からRPMI-培地に馴化し、馴化による抗体産生能の低下が無いことを確認したうえで、再度限界希釈を行い、完全なクローン化を行った。以上の操作により、TF/ファクターVIIa複合体とファクターXとの結合を強く阻害する抗体6種 (ATR-2, 3, 4, 5, 7及び8) を産生するハイブリドーマが樹立できた。

【0111】3. 腹水の作製および抗体の精製

樹立したハイブリドーマの腹水の作製は常法に従って行った。すなわち、in vitroで継代したハイブリドーマ10⁶ 個を、あらかじめ鯨動物油を2回腹腔内に投与しておいたBalb/c系雌性マウスの腹腔内に移植した。移植後1~2週目で腹部が肥大したマウスから腹水を回収した。腹水からの抗体の精製は、Protein A カラム (日本ガイシ) を装填したConSepLC100 システム (Millipore) を用いて行った。

【0112】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

- <110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
- <120> Complex of anti-tissue factor antibody
- <130> 994674
- <160> 1
- <210> 1
- <211> 295

<212> PRT

<213> Homosapiens

<220>

<223> Amino acid sequence of human tissue factor

<400> 1

<400> 2

```

Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val
      -30          -25          -20
Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala
      15          -10          -5          -1
Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
      1           5           10          15
Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
      20          25          30
Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
      35          40          45
Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
      50          55          60
Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
      65          70          75          80
Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
      85          90          95
Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
      100         105         110
Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
      115         120         125
Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
      130         135         140
Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
      145         150         155         160
Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
      165         170         175
Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
      180         185         190
Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
      195         200         205
Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile
      210         215         220
Gly Ala Val Val Phe Val Val Ile Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile
      225         230         235         240
Ser Leu His Lys Cys Arg Lys Ala Gly Val Gly Gln Ser Trp Lys Glu
      245         250         255
Asn Ser Pro Leu Asn Val Ser
      260

```

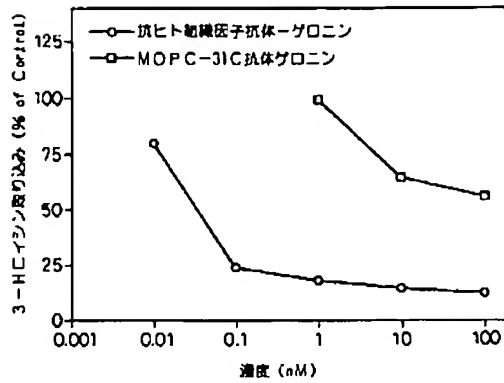
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明の抗ヒト組織因子抗体-グロニン複合体、及び対照としてのMPC-31C抗体-グロニン複合体の、ヒト膀胱癌由来細胞J82により³H-ロイシンの取り込みに対する抑制効果（タンパク質合成抑制効

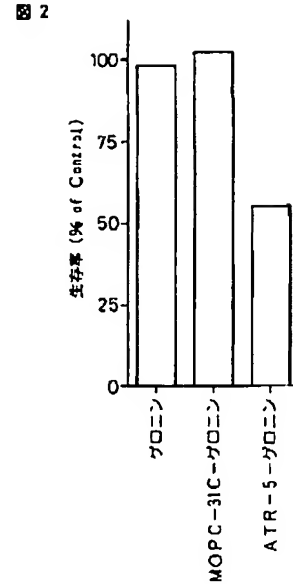
果）を比較して示すグラフである。

【図2】図2は、抗ヒト組織因子抗体グロニンとの複合体、並びに対照としてのMPC-31Cとグロニンとの複合体及びグロニン単独、によるJ82細胞に対する殺細胞効果を比較したグラフである。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	ターム (参考)
C 07 K 14/52		C 07 K 14/52	
14/745	ZNA	14/745	ZNA
16/36		16/36	
19/00		19/00	
// C 12 P 21/08		C 12 P 21/08	
(72)発明者 川田 洋充		F ターム (参考)	4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外			DA01 DA05
製薬株式会社内			4C084 AA14 AA17 MA24 NA14 ZB261
(72)発明者 長尾 俊介			ZB262 ZC012
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外			4C085 AA14 AA24 AA26 CC03 CC23
製薬株式会社内			DD59 EE01 KA04 KA05 LL18
			4H045 AA11 AA30 BA10 BA33 BA34
			BA41 BA42 BA50 BA53 CA40
			CA46 DA04 DA14 DA15 DA75
			DA76 DA83 DA86 EA28 FA72
			FA73 FA74 HA05 HA07

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.